Korean J. Ginseng Sci.
Vol. 22, No. 1, 1~10(1998)

홍삼 분획물이 감마선을 조사한 생쥐 간에서 항산화물질과 지질과산화에 미치는 방사선 보호효과

김동윤 · 장재철[1]

군산전문대학 방사선과. [1]군산대학교 자연과학대학 화학과

(1997년 11월 27일 접수)

Radioprotective Effect of Ginseng Components on Antioxidant Enzymes, Glutathione and Lipid Peroxidation of Liver in γ-Irradiated Mice

Dong-Yun Kim and [1]Jae-Chul Chang

Department of Radiotechnology, Kunsan Junior College, Kunsan 573-110, Korea
[1]Department of Chemistry, Kunsan National University, Kunsan 573-701, Korea

(Received November 27, 1997)

Abstract : In the present study, to determine whether the antioxidative components of Korean red ginseng protect against radiation demage and the possible relationship among the radioprotective effects and antioxidant actions, the effects of total saponin (200 mg/kg, ip) and lipophilic fraction (200 mg/kg, oral) pretrement of mice on the survival ratio, major antioxidant enzymes (SOD, catalase and glutathione peroxidase) activities, glutathione levels and lipid peroxidation in the liver were examined for 2 weeks after whole γ-body γ-irradiation (6.5 Gy). The 30-day survival ratio increased from 10% to 57% and 40% for mice treated with total saponin and lipophilic fraction, respectively. On day 14 after γ-irradiation, the ginseng total saponin pretreatment produced a slight increase of antioxidant enzymes activities and significantly increased reduced glutathione (GSH) contents ($p<0.05$) in the liver compared with non-treated group. Pretreatment with ginseng total saponin significantly deceased GSSG/total GSH ratio ($p<0.05$) without change of GSSG in the liver and inhibited the radiation-induced incease in the hepatic malondialdehyde levels. ($p<0.05$) In these results, GSH plays an important roles in the liver in several detoxification and the reduction of lipid peroxides. Thus, it appears that total saponin of red ginseng exerts its radioprotective effect by acclerating the production of endogenous antioxidants, such as glutathione from radiation induced damages and thereby oxygen free radicals.

Key words : Korean red ginseng, Radioprotective effect, Antioxidant enzyme, Lipid peroxidation.

서 론

생물체가 전리방사선에 조사되면 여러 생물학적 장해의 발생빈도가 증가하게 되며 방사선 장해의 발생기전은 조직내 물의 방사선 분해과정에서 생성되는 유리기들에 의한 간접작용의 결과라고 알려져 있다. 생체조직이 방사선 에너지를 흡수하면 조직의 구성분자(주로 물분자)와 여기, 전리작용에 의해 개시되는 물리화학적 단계에서 hydrogen atom(· H), hydrated electron(e^-_{aq})그리고 hydroxyl radical (· OH)과 같은 일차 유리기들이 형성되며,[1)] 일차적으로 생성된 유리기들은 용존산소나 철, 구리 등 전이금속의 존재하에 여러 반응단계를 거쳐 2차 유리기들(superoxide radical, hydrogen peroxide, al-

koxy radical, peroxyradical)을 생성하게 된다. 이러한 유리기들은 생체내에서 단백질의 SH기나 DNA와 반응하여 화학결합의 절단이나 가교결합의 형성 등 생체 구성 분자의 구조적 변화를 야기시키고[2] 이로 인해 효소활성의 저하와 DNA, 지질 및 단백질 등을 손상시킬뿐만 아니라 세포막의 불포화지방산과 일련의 연쇄반응을 통하여 지질과산화가 유발된다.[3,4] 과산화지질의 증가는 세포에 산화적 손상을 주어 기관의 생리적 기능을 저하시킴으로써 동맥경화, 간질환, 당뇨병, 심장병 및 암 등의 여러 가지 질병을 초래하여 결국에는 노화와 유전적장해의 원인이 되는 것으로 알려져 있다.[5]

생체에는 이와같은 유리기들의 유해한 작용에 대하여 효율적으로 조절할 수 있는 방어체계를 갖추고 있으며 그 방어기전은 생체내에 항산화활성 물질이 존재하므로서 유리기들의 생성을 억제하거나 생성된 유리기들을 제거하기 때문이라고 밝혀져 있다.[2]

유리기 생성의 증가 및 항산화적 방어력의 감소로 인하여 야기되는 지질과산화 반응은 항산화효소의 활성 및 glutathione의 항산화작용과 관련이 있는데, 고선량의 방사선 조사,[6] paraquat 투여,[7] 구리 결핍식이[8] 등으로 인한 SOD 활성 저하는 지질과산화를 촉진시키며 저선량의 방사선 조사,[9] 인삼성분의 투여[10]로 SOD 활성이 증가되어 지질과산화가 억제되었다는 보고들이 있다. 또한 동물조직 중 nonprotein thiol의 대부분을 차지하는 환원형 glutathione(GSH)도 유리기의 scavenger로서 또한 H_2O_2 및 과산화지질을 대사시키는 glutathione peroxidase의 기질로서 세포내 항산화제들 중에서 중요한 역할을 담당하고 있는데, 생체내 glutathione의 결핍은 지질과산화 반응을 촉진시키며 환원형 GSH, 산화형 GSH(GSSG)및 GSSG/GSH 비율의 측정은 조직세포내의 redox 및 detoxification 상태의 평가에 중요하며 GSSG형성은 활성산소종 생성의 유용한 정량적 지표가 되기 때문에 지질과산화 정도나 조직손상의 유발과 직접적으로 관련되어 있는 것으로 생각되고 있다.[11] 따라서 생체조직에서 고선량의 방사선 조사로 인한 유리기 생성의 증가는 생체내 항산화효소들의 활성 저하나 glutathione 등의 항산화제 함량 감소를 야기시킴으로써 지질과산화 반응이 촉진되며 이때 항산화제의 첨가는 과산화 지질의 생성을 효과적으로 억제할 수 있기 때문에 전리방사선으로 인한 장해로부터 생체 방어능력이 향상될 것으로 생각된다.[12]

유리기들에 의해 유발된 과산화지질의 증가가 각종 질환 및 노화의 원인이라는 사실이 밝혀지면서[5] 인삼의 항산화작용 및 그 활성성분에 대한 연구가 활발히 진행되어 paraquat 유인 독성과 같은 활성산소에 대하여 보호작용을 한다는 보고,[13] panaxydol, panaoxynol, panaxytriol 등의 polyacethylene계 성분이 CCl_4로 유도된 간독성에 보호작용이 있다는 보고,[14] ginsenoside Rb_2의 노화촉진 마우스에서 항산화작용에 관한 보고,[10] 인삼 추출물이 stress를 가한 쥐에서 지질과산화를 효과적으로 억제했다는 보고들이 있으며,[15] 이러한 인삼의 항산화 작용기전은 saponin 등이 조직내의 내인성 항산화 물질의 함량을 증가시키고[10] 인삼의 항산화 작용은 단일성분에 의한 직접적인 작용이라기 보다는 여러 성분들의 조화를 통한 정상화 효과에 의한 것이라는 주장[16]들이 있으나 인삼의 항산화 활성성분 및 그 기전에 대하여 현재까지 확실히 규명되어 있지는 않다.

인삼의 방사선 보호효과에 대한 연구는 지금까지 인삼추출물을 방사선 조사 전, 후에 실험동물에 투여하여 생존율,[17] 단백질의 함량과 효소의 활성도[18] 그리고 흉선, 비장 및 혈액상에 미치는 영향,[13,19] 항산화효소 활성 및 지질과산화 수준변화에 관한 연구가[20] 진행되어 인삼은 방사선조사로 인하여 손상된 조직 등의 회복능력을 강화시킴으로써 방사선 보호효과를 나타내는 것으로 알려져 있을 뿐 방사선 보호작용에 효과적인 인삼성분 및 그 기전 등에 관한 연구는 미흡한 실정이다. 대부분의 방사선 보호제가 유리기 scavenger로 작용하여 유리기에 의한 지질과산화와 조직의 산화적 손상을 억제한다는 보고들과 인삼의 항산화효과는 항산화 활성성분이 내인성 항산화 물질의 생성을 촉진시킴으로써 지질과산화를 억제하기 때문이라는 주장들을 종합하여 볼 때 인삼의 방사선 방호효과의 작용기전은 항산화 활성성분에 의한 항산화 작용과 관련이 있을 것으로 생각된다.

본 연구에서는 생쥐에 반치사선량 정도의 감마선 조사전에 항산화 활성성분으로 알려진 홍삼의 총사포닌 분획과 지용성 분획을 투여하여 간조직에서의 SOD, catalase, glutathione peroxidase의 활성과 환원형 glutathione(GSH), 산화형 glutathione(GSSG) 및 지질과산화의 최종 산물인 MDA의 함량을 측정하고 급성 방사선 장해에 따른 30일 생존율을 검사하여

방사선 조사로 인한 항산화 효소들의 활성 및 glutathione의 함량 변화가 지질과산화에 미치는 영향과 인삼의 방사선 보호효과와 항산화작용과의 상호관련성에 대하여 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

실험동물은 녹십자(주)지정 사육소인 경남축산에서 분양받은 4주령의 ICR계 수컷 생쥐를 실온이 24±4℃로 유지되는 사육실에서 사료와 물을 자의로 먹을 수 있게 하였다. 분양받은 생쥐는 이와 같은 조건에서 일주일간 적응시킨 후 각 실험군으로 분류하였으며 실험에는 체중이 20~25 g인 생쥐만을 사용하였다.

실험에 사용한 표준시약은 Sigma사 제품을 사용하였고 기타 시약은 일급시약을 사용하였으며 실험 동물에 투여한 홍삼시료는 한국인삼연초연구원의 경작시험장에서 재배한 6년근 원료 수삼으로 제조한 홍삼을 사용하여 부위별로 적정 혼합하여 분리한 총 사포닌과 지용성 분획으로서 한국인삼연초연구원에서 공급받아 사용하였다.

2. 실험방법

(1) 실험동물처리

체중 20~25 g의 수컷 생쥐 5마리를 1군으로 하여 정상 대조군, 생리식염수 투여후 방사선조사군(R), 홍삼 총 사포닌 투여후 방사선조사군(TS+R), 홍삼 지용성 분획 투여후 방사선조사군(L+R)으로 분류하였다(Table 1).

인삼성분의 투여는 방사선조사 24시간 전에 홍삼의 총사포닌은 생리식염수에 녹여 200 mg/kg/0.1 ml 용량으로 복강주사로, 지용성 분획은 올리브유에 녹여 200 mg/kg/0.1 ml 씩 구강으로 투여하였다. 방사선조사는 ^{60}Co γ 선원을 이용하여 6.5 Gy(1.01 Gy/min)의 선량을 1회 전신조사 하였다. 급성방사선장해에 따른 30일 생존율을 검사하기 위해서는 생쥐를 각 실험군당 30마리씩 분류하여 이상과 같은 방법으로 처리하였으며 방사선 조사후 30일간 동일조건으로 사육하면서 1일 2회씩 생존 여부를 조사하였다.

Table 1. Classification of experimental groups

Groups*	Irradiation (Gy/Whole-	Ginseng components (mg/kg, body wt.)
Control	–	–
R	6.5	–
TS+R	6.5	200
L+R	6.5	200

*Control : saline (0.1 ml) was only intraperioneally (ip) injected, R : saline was ip injected at 24 hr before γ-iradiation, TS+R : total saponin fraction of red ginseng was ip injected at 24 hr before γ-iradiation, L+R : lipophilic fraction of red ginseng was administerd at 24 hr before γ-iradiation.

(2) 분석 시료 제조

감마선조사 후 4시간, 1일, 3일, 7일 그리고 14일째에 16시간 절식시킨 생쥐는 경추탈구로 희생시켜 간을 적출하여 차거운 생리식염수로 세척한 다음 무게를 달고 간조직을 얼음 결정상태의 생리식염수에 넣어 세절하고 3회 수세하여 혈액을 제거하였으며 sucrose/EDTA(0.25 M/1 mM)용액내에서 마쇄기(Potter-Elvehijem homogenizer)로 분쇄하여 10% 균질액을 만들었다. 간균질액을 원심분리(1,000×g, 10분)하여 얻어진 상등액을 superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase 활성 및 지질과산화(malondialdehyde; MDA) 함량의 측정시료로 사용하였다. 위 상등액 일부를 취하여 다시 원심분리(15,000×g)하여 얻어진 상등액을 total glutathione (GSH+GSSG)과 glutathione disulphide(GSSG)함량 측정시료로 사용하였으며 이상의 모든 조작은 0~4℃에서 시행하였다.

(3) 효소의 활성 측정

Total SOD 활성은 Flohe와 Otting[21]의 ferricytochrome c reduction assay에 의하여 측정하였다. 5 μM xanthine, 20 μM cytochrome c와 0.1 mM EDTA가 함유된 50 mM 인산완충액(pH 7.8)이 혼합된 반응액 2.9 ml에 희석시료 50 μl를 넣은 후 50 μl의 xanthine oxidase(시료를 가하지 않은 반응에서 흡광도 증가가 550 nm에서 분당 0.025가 되도록 조절한것)를 가한 다음 25℃에서 파장 550 nm에서의 흡광도 증가속도를 측정하였으며, SOD 활성도는 위의 조건에서 cytochrome c의 환원속도를 50% 억제하는 효소의 양을 1 unit로 표시하였다.

Catalase 활성은 Aebi[22]의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 50 mM 인산완충액(pH 7.0)으로 희석시킨 시료 2.0 ml에 30 mM H_2O_2 용액 1.0 ml를 넣은 후 240 nm에서 흡광도 변화를 측정하였다. Catalase의 활성

도는 1분 동안에 1 μmol의 H_2O_2를 분해시키는 효소의 양을 1 unit로 표시했다.

Glutathione peroxidase 활성은 Flohe 등[23]의 방법으로 측정했다. 1 mM EDTA가 함유된 0.1 M 인산완충액(pH 7.0) 500 μl에 100 μl의 측정시료, 0.24U의 glutathione reductase 100 μl와 10 mM GSH 100 μl를 넣고 전체 반응액에서의 농도가 1 mM이 되도록 NaN_3를 첨가한 후 37℃에서 10분간 incubation 한 다음 1.5 mM NADPH의 농도 변화를 측정하였으며, 위 반응액에 1.5 mM H_2O_2 용액 100 μl를 가한 후 위와 같은 조건에서 5분간 흡광도 감소를 측정하였다. 비효소적 반응은 위와 동일한 조건으로 측정시료 대신에 인산완충액을 넣고 흡광도 변화를 측정하였으며, 단위는 분당 산화된 NADPH μmol를 효소 활성으로 하였다.

(4) 지질과산화 수준의 측정

측정시료의 지질과산화 수준은 지질의 과산화물인 malondialdehyde(MDA)를 Ohkawa 등[24]의 thiobarbituric acid(TBA)법에 의해 측정하였다. 간조직액의 10% 균질액 0.1 ml, 8.1% sodium deoxyl sulfate 용액 0.2 ml, 20% acetic 용액(pH 3.5) 1.5 ml와 0.8% thiobarbituric acid 용액 1.5 ml를 혼합하여 95℃에서 1시간 동안 반응시킨 후 즉시 냉각시키고 n-butanol과 pyridine 혼합용액(15:1, v/v)을 가하여 격렬하게 혼든 다음 원심분리(4,000 rpm, 10분)하여 얻은 상등액(유기층)의 흡광도를 532 nm에서 측정하였으며 표준검량선을 얻기 위하여 1,1,3,3,-tetramethoxypropane (TMP)을 표준품으로 사용하였다.

(5) Glutathione 함량의 측정

간조직에서의 total glutathione(GSH+GSSG)와 산화형 glutathione(GSSG)함량은 Tietze 방법을[25] 변형한 Griffith의 방법[26]에 의해 측정하였다. Total glutathione의 정량은 0.3 mM NADPH/0.125 M phosphate buffer(contain 6.3 mM EDTA, pH 7.5) 용액 700 μl, 6 mM DTNB용액 100 μl와 200 μl의 측정시료를 혼합한 반응액을 30℃로 조절되는 thermostatted cuvette holder에서 4분간 안정화 시킨 다음 glutathione reductase(200 kU/l)용액 5 μl를 가한 후 412 nm에서 흡광도 변화를 1분간 측정하였다. GSSG의 정량은 GSH를 제거하기 위해 측정시료와 2-vinylpyridine(2-VP)를 혼합(50:1, v/v)하여 60분간 방치한 다음 total GSH과 동일한 조건에서 단지 glutathione reductase(200 kU/l)용액을 20 μl로 증가하여 반응시켜 흡광도의 변화를 측정하였다.

(6) 단백질 정량 및 실험결과의 유의성 판정

단백질의 함량은 Lowry 등[27]의 방법으로 측정하였으며 표준품으로 bovine serum albumin을 사용하였다. 한편, 모든 실험 결과의 통계처리는 Sigma plot에 의한 student's *t-test*를 이용하여 상호 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 생존율의 변화

산소는 방사선에 의한 생물학적 손상을 증강시키는 작용을 하며 방사선 장해의 일차적 원인이 방사선 조사에 의해 생성된 유리기들의 생체 구성 분자들에 대한 공격에 기인되기 때문에 이러한 유리기를 포착 제거하는 항산화제들은 방사선 보호제로서 작용할 수 있을 것이다. 본 연구에서 생쥐에 홍삼성분을 투여한 후 감마선을 전신조사하고 급성방사선장해로 인한 생존 여부를 검사한 결과 생쥐들은 대부분 10~20일 사이에 치사되었으며, 30일 생존율은 생리식염수 투여군이 10%인데 비하여 총사포닌 투여군은 57% 그리고 지용성분획 투여군은 40%로서 모두 유의성있는 증가를 보였다(Fig. 1). 방사선에 조사된 생쥐들의 사망율이 방사선 조사 후 10~20일 사이에 급격히 상승하였데 이는 방사선 감수성이 매우 높은 골수세포의 치사로 인한 결과라고 생각되며 홍삼성분을 투여 받은 생쥐에서 사망율이 둔화된 것은 인삼의 항산화 성분이 직, 간접적으로 방사선에 대한 저항성을 증가시켰거나 방사선조사에 의해 손상 받은 골수등 조직세포의 수복과 재생능력을 향상시킨 결과[26]라고 생각된다.

2. 생쥐 간에서 항산화효소의 활성 변화

동물체에서 산소독성의 작용기전은 전리방사선에 의한 생물학적 장해의 발생 기전과 유사하기 때문에[29] 조직내의 항산화효소 활성이나 항산화물질의 수준은 생체의 방사선에 대한 방어체계에 중요한 영향을 미칠 수 있다. Scott[30]는 동물체에서 전리방사선은 반응성이 강한 유리기의 생성원인이 되며 항산화효소들은 방사선에 대한 생체의 저항성을 결정하는데 중요할 것이라고 주장하였는데 이는 여러 조직에서 SOD 활성의 증가가 방사선에 대한 저항성을 증가시켰다는

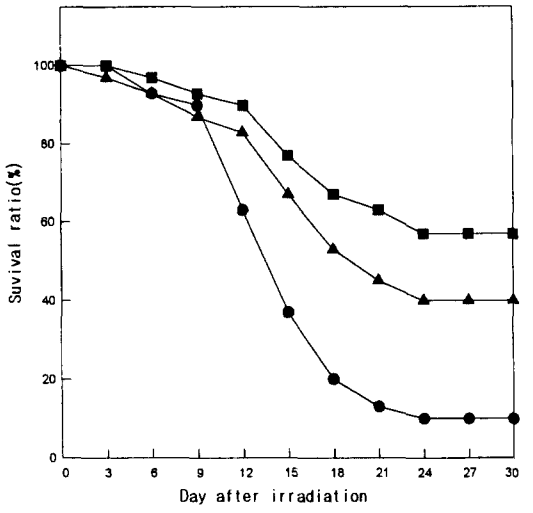

Fig. 1. Effects of ginseng components on 30 day survival ratio of γ-irradiated mice. ●; irradiated group, ■; treated with red ginseng total saponin and irradiated group, ▲; treated with red ginseng lipophilic fraction and irradiated group.

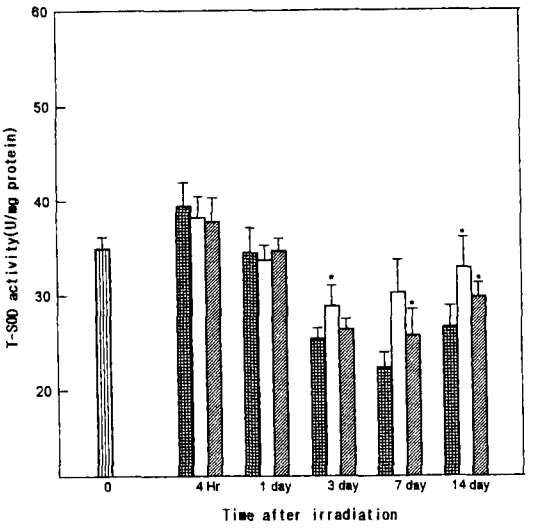

Fig. 2. Time-dependent changes of T-SOD activity affected by ginseng components and post-irradiation. ▥; contol group, ■; irradiated group, □; treated with red ginseng total saponin and irradiated group, ▨; treated with red ginseng lipophilic fraction and irradiated group.
*$p<0.05$; Significantly different from non-ginseng components treated before γ-irradiated groups.

보고[31,32] 들과 일치하는 것이다.

본 연구에서 생쥐에 홍삼의 총사포닌 분획과 지용성 분획을 투여한 후 6.5 Gy의 감마선을 전신 조사한 다음 4시간, 1일, 3일, 7일 그리고 14일째 간조직에서의 total-SOD 활성도를 측정한 결과는 Fig. 2에서와 같이 정상대조군의 SOD 활성은 34.94±1.22 U/mg protein이었으며 방사선 조사전 생리식염수만을 투여한 생쥐에서의 SOD 활성은 방사선조사 직후에 약간 증가한 후 감소하기 시작하여 7일째에 22.30±1.61 U/mg protein으로 가장 낮은 활성도를 보인 후 방사선조사후 14일째에는 약간 증가하는 경향을 보여 정상대조군에 대하여 76%의 활성을 보였다. 방사선 조사전에 홍삼제재를 투여받은 생쥐 간에서의 SOD 활성 변화는 방사선 조사후 초기에 약간 증가한 후 감소하였으나 그 감소폭은 방사선조사전 생리식염수 투여군에 비하여 둔화되었으며 7일째에 홍삼의 총사포닌 투여군은 30.28±3.47 U/mg protein, 지용성분획 투여군은 25.72±2.77 U/mg protein으로 최저치를 나타낸 후 14일째에는 활성이 증가하여 방사선조사 전 생리적 식염수 투여군에 비하여 총사포닌 투여군은 24%, 지용성분획 투여군은 12% 상승되어 방사선조사로 인한 산화적 손상으로부터 점차 회복되는 경향을 보였다.

Catalase 와 glutathione peroxidase의 활성도 변화는 Fig. 3, Fig. 4에 나타낸 바와 같이 정상대조군의 활성은 각각 221.38±15.10 U/mg protein, 2.10±0.12 U/mg protein 이었으며 방사선조사 전 생리식염수 투여군에서 catalase의 활성도는 방사선조사 후 7일째에는 145.00±28.83 U/mg protein으로 정상대조군에 대하여 67%, glutathione peroxidase의 활성은 방사선 조사후 3일째에 1.54±0.15 U/mg protein 으로 최저값을 보인후 약간 증가하는 추세를 보였다. 홍삼제재를 투여 받은 생쥐들에서의 활성은 방사선조사전 생리식염수 투여군과 비슷한 경향을 보였으나 그 감소폭이 둔화되었으며, 방사선조사 후 14일째에 catalase와 glutathione peroxidase의 활성이 방사선조사 전 생리식염수 투여군에 비하여 총사포닌 투여군은 각각 10%, 13% 증가되었으나 지용성분획 투여군은 모두 비슷한 활성도를 보였다.

본 연구에서 6.5 Gy의 감마선을 조사받은 생쥐 간에서 SOD나 catalase의 활성은 방사선조사 직후 약간 증가한 후 저하되었으며 glutathione peroxodase의

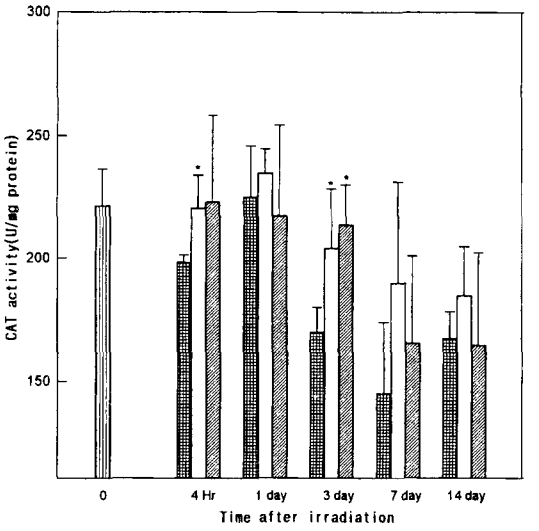

Fig. 3. Time-dependent changes of catalase activity affected by ginseng components and post-irradiation. ▥; contol group, ■; irradiated group, □; treated with red ginseng total saponin and irradiated group, ▨; treated with red ginseng lipophilic fraction and irradiated group.
*$p<0.05$; Significantly different from non-ginseng components treated before γ-irradiated groups.

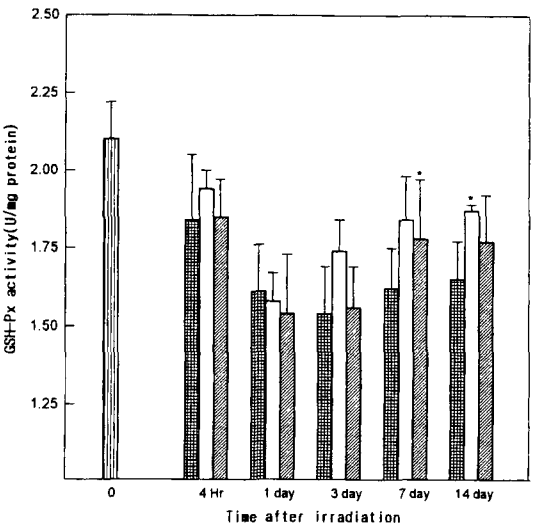

Fig. 4. Time-dependent changes of glutathione peroxidase activity affected by ginseng components and post-irradiation. ▥; contol group, ■; irradiated group, □; treated with red ginseng total saponin and irradiated group, ▨; treated with red ginseng lipophilic fraction and irradiated group.
*$p<0.05$; Significantly different from non-ginseng components treated before γ-irradiated groups.

활성은 방사선조사 직후부터 감소한 다음 14일째에는 약간 상승되는 경향을 보인 반면, MDA 함량은 방사선조사 직후부터 지속적으로 상승된 후 역시 14일째에 약간 감소하는 것으로 나타났는데 초기에 SOD의 활성이 약간 증가된 것은 유리기들의 생성은 방사선조사 후 약 4시간경에 최대가 되기 때문에 생성이 촉진된 유리기들을 제거하기 위한 생체 방어기전의 일종이거나[33] 방사선조사로 인한 조직내 산소분압의 일시적 상승이 SOD 합성 증가를 유도한 것이며[9] SOD의 작용에 의해 생성된 H_2O_2를 분해하기 위해 catalase의 활성도 증가된 것으로 생각되며 그 후 지속적으로 저하된 것은 방사선의 직접작용이나 간접작용에 의해 조직세포들이 손상되거나 괴사되어 항산화 효소들의 합성이 저해되거나 그 활성이 저하된 것으로 생각된다.

3. Glutathione 함량의 변화

Glutathione은 γ-glutamylcystine synthetase와 GSH synthetase에 의해 cysteine과 glutamate로부터 합성된 tripeptide로서 단백질의 분해 및 합성과 DNA의 합성에 관여하며 유리기나 독성화합물 그리고 방사선조사 등의 손상으로부터 세포를 보호하는 기능을 가지고 있다.[34] 따라서 GSH 및 GSSG의 생체내 수준은 지질과산화 정도나 방사선조사로 인한 조직 손상의 유발과 직접적으로 관련되어 있는 것으로 생각되는데, 이러한 증거로서 흰쥐에 만성적 에탄올 투여는 간에서의 total GSH 함량을 감소시켰으며 반면에 GSSG/total GSH 비율을 유의성있게 증가했다는 보고,[35] 약물에 의한 의도적인 GSH 고갈은 지질과산화를 극적으로 증가시켰다는 보고,[36] *in vitro*에서 방사선 조사는 GSH 함량을 저하시키며 GSH 저하는 방사선 감수성을 증가시킨다는 보고,[37] GSH가 결핍된 조건에서는 방사선 보호제의 방사선 보호효과는 없었다는 보고[38] 그리고 GSH의 결핍은 저산소나 과산화세포들에 대하여 방사선 증감제로 작용될 수 있다는 주장[39]들이 있다.

방사선조사전에 생리식염수 및 홍삼제재를 투여받은 생쥐 간에서 glutathione의 함량 변화를 알아보기 위해 GSH 함량과 GSSG/total GSH 비율을 측정

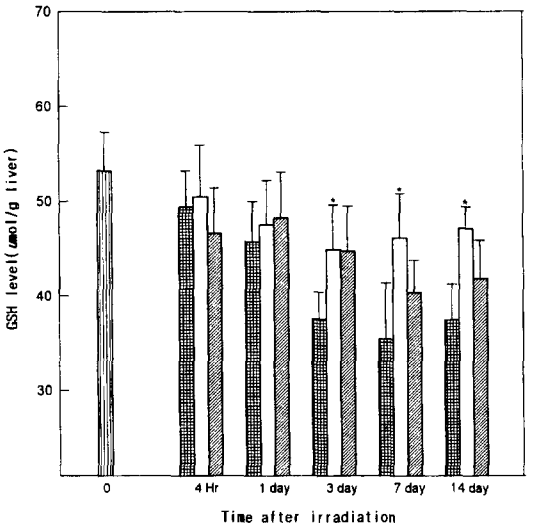

Fig. 5. Time-dependent changes of GSH contents by ginseng components and post-irradiation. ▥; contol group, ■; irradiated group, □; treated with red ginseng total saponin and irradiated group, ▨; treated with red ginseng lipophilic fraction and irradiated group.
*$p<0.05$; Significantly different from non-ginseng components treated before γ-irradiated groups.

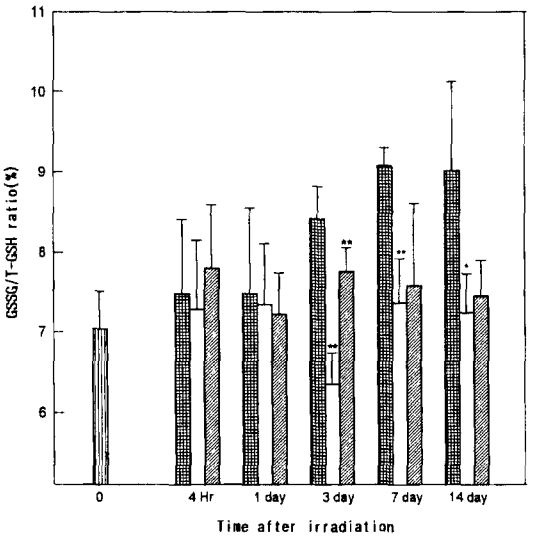

Fig. 6. Time-dependent changes of GSSG/T-GSH ratio affected by ginseng components and post-irradiation. ▥; contol group, ■; irradiated group, □; treated with red ginseng total saponin and irradiated group, ▨; treated with red ginseng lipophilic fraction and irradiated group.
*$p<0.05$, **$p<0.01$; Significantly different from non-ginseng components treated before γ-irradiated groups.

한 결과는 Fig. 5, Fig. 6와 같다. 정상대조군에서의 GSH 함량은 53.24±4.04 μmol/g liver 그리고 GSSG/total GSH 비율은 7.04±0.47%로 나타났으며, 방사선조사전 생리식염수 투여군에서는 GSH 함량은 방사선조사 후 감소하여 7일째에 35.46±5.92 μmol/g liver로 정상대조군에 대하여 67%로 최저값을 보였다. 조직에서 산화적 손상의 지표가 되는 GSSG/total GSH 비율은 방사선조사 직후 부터 상승하여 7일째에는 정상대조군에 대하여 129%로 유의하게 증가되었다. 방사선조사 전에 홍삼제재를 투여받은 생쥐들의 GSH의 함량은 방사선 조사후 모든군에서 감소하는 경향을 보였으나 정상대조군에 대해 유의한 차이는 없었으며 방사선조사 후 14일째에 생리식염수 투여군에 비하여 총사포닌 투여군은 26%, 지용성 분획 투여군은 12% 증가되었으며, GSSG/total GSH 비율도 GSH 변화와 비슷한 경향을 보여 방사선조사후 14일째에는 생리식염수 투여군에 비하여 총사포닌 투여군은 20%, 지용성분획 투여군은 11% 저하되었다. 본 연구에서 방사선조사로 인하여 생쥐 간에서의 GSH 함량이 유의성있게 감소된 반면 GSSG/total GSH 비율은 증가하였는데 이는 GSSG 함량이 변화하지 않은 것으로 볼때 GSH의 유의한 감소 때문이라 생각된다. 또한 GSH의 감소 원인은 GSH가 유리기의 직접적인 scavenger로서 H_2O_2 및 lipoperoxides로부터 세포를 보호하기 위한 glutathione peroxidase의 기질로서, 수소 기여에 의한 DNA radicals와 같은 분자 손상의 회복이나 단백질의 -SH를 환원상태로 유지하기 위해 더욱 소모 되었거나[39] MDA 수준의 증가로 볼 때 과산화지질의 증가로 조직이 손상받아 glutathione의 합성 능력이 저해 되었기 때문으로 생각된다.[40]

4. 지질과산화 수준의 변화

방사선조사전에 생리식염수 및 홍삼제재를 투여받은 생쥐 간에서의 지질과산화 수준 변화를 관찰하기 위해 지질과산화의 최종 산물인 malondialdehyde(MDA)의 함량을 측정한 결과는 Fig. 7에서와 같이 정상대조군에서의 MDA 함량은 59.24±4.76 nmol/g liver인데 비해 방사선조사전 생리식염수 투여군에서는 방사선조사 직후부터 증가하여 7일째에

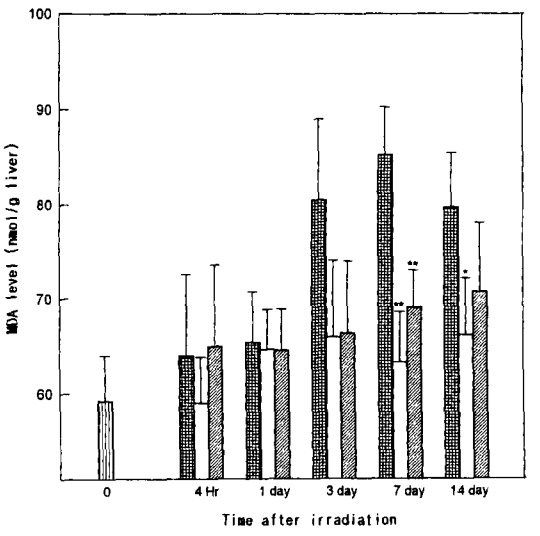

Fig. 7. Time-dependent changes of lipid peroxidation levels affected by ginseng components and post-irradiation. ▥; contol group, ■; irradiated group, □; treated with red ginseng total saponin and irradiated group, ▨; treated with red ginseng lipophilic fraction and irradiated group. *p<0.05, **p<0.01; Significantly different from non-ginseng components treated before γ-irradiated groups.

85.22±5.03 nmol/g liver로 정상대조군에 대하여 144%로 가장 높은 값을 보인 후 14일째에는 135%로 약간 감소되었다. 방사선조사전에 홍삼제재를 투여받은 생쥐들에서도 방사선조사 직후부터 MDA함량이 증가되어 14일째에 총 사포닌 투여군은 66.14±5.99 nmol/g liver, 지용성분획 투여군은 70.68±7.37 nmol/g liver로 생리식염수 투여군에 비하여 총 사포닌 투여군은 17%, 지용성분획 투여군은 11% 감소되었다.

홍삼의 항산화활성 성분이 방사선에 의한 장해를 경감시키는 작용이 어떠한 작용에 기인하는가를 알아보기 위해 유리기 억제계에 관여하는 항산화효소인 SOD, catalase 및 glutathione peroxidase의 활성변화와 비효소계 항산화 물질인 glutathione의 함량변화 그리고 유리기 생성의 증가 및 항산화적 방어력의 감소로 인하여 야기되는 지질과산화의 최종산물인 MDA의 함량 변화를 생쥐 간에서 관찰한 결과, 홍삼제재를 투여하지 않은 생쥐군에서는 방사선조사 후 14일째에 total-SOD, catalase, glutathione peroxidase의 활성과 GSH의 함량은 정상대조군에 비하여 현저하게 저하되었으며 산화적 손상의 지표가 되는 GSSG/total GSH 비율 및 MDA의 함량은 뚜렷하게 증가한 반면, 방사선조사 전에 홍삼제재를 투여한 경우에는 이러한 변화폭이 감소되어 방사선 조사로 인한 항산화효소의 활성 및 glutathione의 함량 저하와 MDA의 함량 증가가 억제되는 경향을 보여 방사선조사 후 14일째에 생리식염수 투여군에 비하여 glutathione peroxidase의 활성과 GSH의 함량은 유의하게 증가하였으며 GSSG/total GSH 비율과 MDA 함량은 현저하게 감소되었다. 이와 같은 결과는 스트레스를 가한 흰쥐에 ginsenoside Rb_1이나 노화생쥐에 ginsenoside Rb_2를 투여 했을 때 항산화효소들의 활성이 증가되어 이로 인해 지질과산화가 억제되었다는 보고들[10,16]과는 일치하지 않으나 흰쥐에 장기간의 흡연을 시켰을 때, 폐조직에서의 SOD, catalase, glutathine peroxidase 활성의 증가와 total-SH 함량 감소 그리고 지질과산화의 증가는 뚜렷하였으나 항산화효소들의 증가는 폐나 기관의 산화적 조직손상을 보호하지는 못하였으며 인삼추출물을 장기간 복용시킨 흰쥐에서는 흡연으로 인해 촉진된 지질과산화가 현저히 둔화되어 유리기에 의한 폐손상을 억제시켰다는 보고[31]와는 일치하는 것으로서 방사선조사전에 홍삼제재의 투여로 인한 지질과산화 반응이 억제된 원인은 SOD나 catalase와 같은 항산화 효소의 직접작용이라기 보다는 홍삼의 항산화 성분이 glutathione이나 sulfhydryl group 또는 albumin과 같은 내인성 항산화물질의 합성능력을 강화시킴으로써 산화물에 대한 방어력이 향상되어 나타난 결과라고 생각된다. 홍삼의 지용성분획 투여군에서도 방사선조사로 인한 사망률은 억제되었으나 항산화효소들의 활성이나 glutathione과 MDA의 함량은 생리식염수 투여군에 비하여 유의한 변화가 없었다. 이러한 부분적인 방사선보호효과는 홍삼의 지용성 성분의 직접작용이라기 보다는 올리브유에 의한 효과이거나 투여방법의 차이 때문인 것으로 생각된다.

이상의 결과에서 전리방사선조사에 의해 생체내 유리기의 생성이 촉진되며 내인성 항산화물질의 조직내 수준이 감소되어 산화적 방어력이 약화됨으로써 지질과산화가 촉진되고 이로 인하여 세포가 손상을 받아 결과적으로 사망률이 증가된 것으로 지질과산화는 방사선장해 발생의 한 요인으로 작용된다고 생각되며 방사선조사 전에 홍삼의 사포닌 성분을 투

여했을 때 이러한 변화나 작용이 뚜렷이 억제된 사실과 방사선보호제의 작용기전이 생물체에서 방사선 감수성은 산소 존재하에 증강되며 또한 방사선 조사로 인해 생성되는 1차 유리기들은 산소존재하에 여러 연쇄 반응을 통하여 반응성이 매우 강한 hydroxyl radical이나 peroxy radical 같은 2차 유리기를 생성하기 때문에 방사선 보호제는 방사선 조사 후 유리기 생성단계에서 1차 유리기들과 경쟁적으로 산소와 반응하여 2차 유리기의 생성을 억제하는 유리기 scavenger로 작용하기 때문이라는 주장을 고려하여 볼 때 홍삼의 사포닌 성분은 방사선에 보호효과가 있는 것으로 간주할 수 있다고 보며, 일종의 산화 스트레스라고 할 수 있는 방사선조사로 인하여 항산화제의 량이 현저히 감소되고 홍삼 사포닌의 첨가로 지질과산화가 효과적으로 억제된 것으로 볼 때, 홍삼 사포닌의 방사선보호작용은 항산화작용과 관련이 있으며 홍삼 사포닌의 방사선보호효과는 효소적 항산화작용보다는 비효소적 항산화작용에 의해 방사선에 대한 생체의 방어능력이 증강되어 나타난 결과라고 생각된다.

요 약

인삼의 항산화 활성성분이 방사선 보호작용에 미치는 효과 및 항산화작용과의 상호관련성을 알아보기 위하여 ICR계 생쥐에 홍삼성분을 투여한 후 감마선을 1회 전신조사하여 30일 생존율 그리고 간에서의 SOD, catalase, glutathione peroxidase 활성 및 glutathione 함량과 지질과산화 수준의 변화를 2주 동안 관찰하였다. 방사선조사(6.5Gy)전에 홍삼의 총 사포닌 분획(200 mg/kg)과 지용성 분획(200 mg/kg)의 투여로 30일 생존율은 10%에서 각각 57%, 40%로 증가되었다. 방사선조사 전 홍삼사포닌을 투여한 생쥐에서 방사선조사후 14일째에 방사선조사전 생리식염수 투여군에 비하여 방사선조사에 의해 증가된 간의 MDA 함량은 17% 저하되었으며($p<0.05$) 항산화효소인 SOD, catalase, glutathione peroxidase의 활성은 방사선조사 전 생리식염수 투여군에 비하여 각각 16%, 10% 그리고 GSH 함량은 26%($p<0.05$) 증가되었으나 GSSG 함량은 변화가 없었으며 GSSG/total GSH 비율은 20%($p<0.05$) 저하되었다. 이상의 결과로부터 홍삼사포닌은 방사선 보호효과에 유효한 성분으로 비효소적 항산화작용을 나타내는 glutathione과 같은 내인성 항산화물질의 생성을 촉진시켜 지질과산화를 억제하여 방사선조사로 생성된 유리기에 의한 조직손상에 대한 신체 방어능력을 증강시킴으로서 방사선 보호효과를 나타내는 것으로 사료된다.

감사의 말씀

본 연구를 위해서 홍삼시료를 제공하여 주신 한국인삼연초연구원의 최강주 박사님께 감사드립니다.

인 용 문 헌

1. Singh, A. and Singh, H. : *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **39**, 69 (1982).
2. Fridovich, I. : *Arch Biochem. Biophys.*, **247**, 1 (1986).
3. Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. : *Biochem. J.*, **219**, 1 (1984).
4. Emerit, J. and Chaudiere, J. : *CRC handbook of free radical and antioxidants in biomedicine.*, Miquel, J., Quintanilha, A. T. and Weber, H.(eds.), Vol. 1, CRC Press, Florida, p. 177 (1989).
5. Bowman, P. D. : *CRC handbook of cell biology of aging.*, Cristofalo, V. J., Adelman, R. C. and Roth, G. S.(eds.), CRC press, Florida, p. 117 (1986).
6. Kergonue, J. F., Thiriot, C., Braquet, M., Ducousso, R. and Rocquet, G. : *Biochimie.*, **68**(2), 311 (1986).
7. Salovsky, P. and Shopova, V. : *Environ. Res.*, **60**(1), 44 (1993).
8. Balevska, P. S., Russavanov, E. M. and Kassabanova, T. A. : *J. Biochem.*, **13**, 483 (1981).
9. Yamaoka, K., Edamatsu, R. and Mori, A. : *Free. Radic. Biol. Med.*, **11**, 299 (1991).
10. 오미현, 정해영, 양관석, 김규원, 정한영, 오우라히꼬끼치, 요코자와다카꼬. : *Korean Biochem. J.*, **25**(5), 492 (1992).
11. Vendemiale, G., Altomare, E., Grattagliano, I. and Albano, O. : *J. Hepatol.*, **9**, 359 (1989).
12. Benderitter, M., Maingon, P., Abadie, C., Assem, M., Maupoil, V., Briot, F., Horiot, J. C. and Rochette, L. : *Radiat. Res.*, **144**(1), 64 (1995).
13. Han, B. H., Park, M. H., Woo, L. K., Woo, W. S. and Han, Y. N. : *Korean Biochem. J.*, **12**, 33 (1979).

14. Kim, H. Y., Lee, Y. H. and Kim, S. I. : *Korean Biochem. J.*, **22**(1), 12 (1989).
15. Deng, H. L. and Zhang, J. T. : *Chin. Med. J. Engl.*, **104**(5), 395 (1991).
16. Lee, D. W., Sohn, H. O., Lim, H. B., Lee, Y. G., Aprikian, A. G. and Aprikian, G. V. : *Korean J. Ginseng Sci.*, **19**(1), 31 (1995).
17. Takeda, A., Yonezawa, M. and Katoh, N. : *J. Radiat. Res.*, **22**, 323 (1981).
18. Nam, S. Y. and Chung, S. O. : *J. Regional Development (Kyung Hee Univ., Seoul)* **4**, 58 (1973).
19. Yonezawa, M., Katoh, N. and Takeda, A. : *J. Radiat, Res.*, **26**, 436 (1985).
20. Park, Y. S., Kim, Y. G., Jae, C. C. and Kim, D. Y. : *Korean Biochem. J.*, **26**(2), 184 (1993).
21. Flohe, L. and Otting, F. : *Methods in Enzymology.*, Packer, L.(eds.), Academic Press, Inc., New York, p. 93 (1984).
22. Aebi, H. E. : *Methods of Enzymatic Analysis.*, Bergmyer, H. U.(eds.), Third edition, Vol, 3, Verlag. Chemi. Weinheim, p. 273 (1982).
23. Flohe, L. and Gunxler, W. A. : *Methods in Enzymology.*, Packer, L.(eds.), Academic Press, Inc., New York, p. 114 (1984).
24. Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. : *Anal. Biochem.*, **95**, 351 (1979).
25. Tietze, F. : *Anal. Biochem.*, **27**, 502 (1969).
26. Griffith, O. W. : *Anal. Biochem.*, **106**, 207 (1980).
27. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : *J. Biol. chem.*, **193**, 265 (1951).
28. Kim, S. H., Cho, C. K., Yoo, S. Y., Koh, K. H., Yun, H. G. and Kim, T. H. : *In-Vivo.*, **7**(5), 467 (1993).
29. Gerschman, R., Gilbert, D. L., Nye, S. W., Dwyer, P. and Fenn, W. O. : *Science.*, **119**, 623 (1954).
30. Scott, M. D., Meshnick, S. R. and Eaton, J. W. : *J. Biochem.*, **264**, 2498 (1989).
31. Petkau, A. : *Photochem. Photobiol.*, **28**, 276 (1978).
32. Krizala, J., Stocklasova, A., Kovarova, H. and Ledvina, M. : *Radiat. Res.*, **91**, 507 (1982).
33. Sohn, H. O., Lim, H. B., Lee, D. W. and Kim, Y. T. : *Arch. Toxicol.*, **67**(10), 667 (1993).
34. Kimball, R. E., Reddy, K., Peirce, T. H., Schwartz, L. W., Mustafa, M. G. and Cross, C. E. : *Am. J. Physiol.*, **230**(5), 1425 (1976).
35. Lee, J. W. : *J. Korean Soc. Food Nut.*, **20**(4), 285 (1991).
36. Younes, M. and Siegers, C. P. : *Toxicol. Leff.*, **15**, 213 (1983).
37. Rybina, V. V., Korystov, I. N., Degtiareva, O. V., Dobrovinskaia, O. R. and Eidus, L. K. : *Radiobiologiia.*, **28**(4), 435 (1988).
38. Bump, E. A. and Brown, J. M. : *Pharmacol. Ther.*, **47**(1), 117 (1990).
39. Prager, A., Terry, N. H. and Murray, D. : *Int. J. Radiat. Biol.*, **64**(1), 71 (1993).
40. Adams, J. D., Lauterburg, B. H. and Mitchell, J. R. : *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **227**(3), 749 (1983).